

THESIS

MUNICH

1968

Über die Wirkung von Faktoren
aus dem Humanserum auf die
Elektrophoretische Beweglichkeit
von Säugetierzellen

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

HARALD v. BOEHMER

1968

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie München

Direktor: Prof. Dr. A. Butenandt

ÜBER DIE WIRKUNG VON FAKTOREN AUS DEM HUMANSERUM
AUF DIE ELEKTROPHORETISCHE BEWEGLICHKEIT VON
SÄUGETIERZELLEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Harald v. Boehmer

aus

Freiburg i. Br.

1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. A. Butenandt

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 1968

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1965 bis März 1967 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt und Herrn Professor Dr. G. Ruhenstroth-Bauer danke ich für die Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Inhaltsübersicht

	Seite
Einleitung	1
Methodik	5
Ergebnisse Teil A	17
Ergebnisse Teil B	23
Ergebnisse Teil C	25
Ergebnisse Teil D	32
Ergebnisse Teil E	35
Besprechung	38
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	

Über die Wirkung von Faktoren aus dem Humanserum auf die elektrophoretische Beweglichkeit von Säugetierzellen

In einer Reihe von Arbeiten berichten mehrere Autoren über verschiedene Wirkungen des Humanserums auf bestimmte Säugetierzellen. 1955 fand Fedoroff, daß Humanserum eine cytotoxische Wirkung auf L - Zellen (1, 2) in der Gewebekultur ausübt (3). L - Zellen wurden 1940 im Laboratorium von Earle aus Zellen gezüchtet, die aus subkutanem Fettgewebe von C 3 H - Mäusen, welche mit Methylcholanthren behandelt worden waren, stammen. Fedoroff konnte zeigen, daß für die cytotoxische Wirkung eines frischen Humanserums zwei nicht dialysable Faktoren verantwortlich sind: Ein hitzestabiler Faktor findet sich bei der Fraktion der γ -Globuline (4), ist bei 4° an L - Zellen adsorbierbar (5), besitzt Antikörpereigenschaften (6) und wird auch von abgestorbenen Zellen adsorbiert. Die andere, thermolabile Komponente wird durch Erhitzen auf 56° inaktiviert und soll Komplement sein. Fedoroff gibt an, daß nur menschliches Komplement wirke, während Meerschweinchenkomplement unwirksam sei (4). Nachdem Landy und Shear beobachtet hatten, daß die toxischen Eigenschaften von Bakterien nach Inkubation mit frischem menschlichen Serum verschwinden (7), inkubierten Fedoroff und Mitarbeiter Polysaccharide von Bakterien, die für die toxischen Eigenschaften der Bakterien verantwortlich gemacht werden, mit frischen Humansen und untersuchten anschließend die Wirkung dieser Seren auf L - Zellen. Die Seren wirkten nach dieser Behandlung nicht mehr cytotoxisch (8). Daraus schließt der Autor, daß L - Zellen an ihrer Oberfläche ähnliche Rezeptoren wie diese Bakterien besitzen. Fedoroff diskutiert weiterhin bi- oder polyvalente Antikörper, da die mit Humanserum behandelten Zellen verklumpen oder mit menschlichen Erythrocyten beladen werden können (4). Wachsen L - Zellen über mehrere Generationen in einem

Nährmedium, das frisches Humanserum enthält, werden sie gegen das toxische System resistent, vermehren sich wieder normal und sind nicht in der Lage, den Antikörper zu binden. Die Resistenz äußert sich auch in einer Änderung der morphologischen Struktur der Zellen (9).

1961 entdeckten Ginsburg (10) und Goldberg (11) im menschlichen Serum ein System von zwei Faktoren, das die Vermehrung von Landschütz - Ascites - Tumorzellen in vivo verhindert. Auch sie konnten eine hitzebeständige und hitzelabile Komponente unterscheiden. Der thermostabile Faktor wird an Mäusetumorzellen und menschliche Placentazellen, nicht jedoch an Herz-, Nieren- und Leberzellen vom Menschen adsorbiert. Ginsburg berichtet, daß die hitzelabile Komponente durch β -Globulin zu ersetzen ist (10).

Landy und Mitarbeiter fanden, daß Humanserum die Proliferation von Sarkom-37-Ascites- und anderen Mäusetumorzellen bei einem empfänglichen Wirt verhindert (12). Ähnliche Beobachtungen machten Hotham-Iglewski an Ehrlich-Lettré-Ascites-Tumorzellen (13). Landy konnte durch Inaktivieren von C'-Komponenten des Komplements beweisen, daß es sich um ein Antikörper-Komplement-System mit cytotoxischer Wirkung handelt (12).

Bei der Zucht von HeLa-Zellen in der Gewebekultur beobachteten Saxén und Mitarbeiter, daß ein Nährmedium, welches 30 % frisches menschliches Serum enthält, das Anheften der Zellen an die Glaswand der Kulturflaschen verhindert. Die Zellen verklumpen und sterben ab, wenn sie wiederholt mit Humanserum gefüttert werden (14, 15, 16, 17, 18). Ein Serum, welches einige Tage bei 4° aufbewahrt wurde, verliert diese Wirkung. Häyry berichtet, daß HeLa-Zellen, die sich normalerweise in Form eines Fischgrätenmusters an die Glaswand heften, dieses Verhalten in einem Nährmedium, welches 5 % Humanserum enthält, nicht zeigen (19). Er glaubt, daß Kalzium bei diesem

Effekt eine Rolle spielt und diskutiert die Möglichkeit, daß Serumlipoproteide die Glaswand bedecken und so das Anheften der Zellen verhindern. Ein Anti- β -Lipoprotein soll das Klumpen der Zellen verhindern können (20). Häyry weist weiter in seiner Arbeit darauf hin, daß sowohl die Oberfläche der Zellen als auch die von Glaspartikeln durch menschliches Serum verändert wird (21). Auch Goldberg konnte bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß allein ein cytotoxisches Immunglobulin die Zelloberfläche von Krebs-Ascites-Tumorzellen verändert. Diese Veränderung kommt in einer Umfaltung bestimmter Membranabschnitte zum Ausdruck (11). Erst die Zugabe von Komplement führt zur Degeneration und schließlich zum Untergang der Zelle. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich bereits vor der endgültigen Zerstörung einer Zelle der Beginn einer Degeneration in Veränderungen der Zelloberfläche erfassen lassen könnte.

Veränderungen von Zellmembranen lassen sich morphologisch, durch chemische Analyse oder in einer Wandlung der Membranfunktion erkennen. Darüber hinaus ist es möglich, das Oberflächenpotential von Zellen ohne erkennbare Schädigung dieser Zellen mit Hilfe der Zellelektrophorese zu ermitteln. Die Bedeutung des Ladungsmusters von Zelloberflächen geht daraus hervor, daß bestimmte Zellen ein für ihre Art charakteristisches Oberflächenpotential besitzen, welches durch die Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit bestimmt werden kann (22, 23, 24). Aber auch bestimmte Reifestadien mancher Zellen oder die maligne Entartung drücken sich in einer veränderten Oberflächenladung aus (25, 26). Schließlich konnten auch enzymatische Einwirkungen auf Zellen oder ihre Bedeckung mit Proteinen zellelektrophoretisch erfaßt werden (27, 28).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die cytotoxischen oder ähnlichen Wirkungen des Humanserums gegenüber verschiedenen Säugetierzellen auch in einer Veränderung des

Membranpotentials erfassen lassen. Zu diesem Zweck wurde in Abschnitt A der Arbeit die Wirkung von Humanserum auf die elektrophoretische Beweglichkeit verschiedener Säugetierzellen untersucht. In Abschnitt B wird versucht, die erkennbare Wirkung des menschlichen Serums näher zu charakterisieren, um sie mit den beschriebenen cytotoxischen Wirkungen des Humanserums zu vergleichen. In Abschnitt C wird über die Reinigung zellelektrophoretisch wirksamer Fraktionen berichtet, während in Abschnitt D Experimente zur Frage der Komplementbeteiligung angeführt werden. Schließlich befaßt sich Abschnitt E mit dem Einfluß gereinigter Fraktionen auf die Kultur von L - Zellen.

Methodik

1.) Herkunft der Substanzen

Kaliumbromid, Ammoniumsulfat, Magnesiumacetat, Kalziumchlorid, Tris- (hydroxymethyl) -aminomethan, Natriumchlorid, Natriumacetat p.a., Veronalnatrium: Merck A.G. (Darmstadt); Phosphorsäure: 85 %ige Lösung; Salzsäure: 1 N-Lösung (Fixanol); DEAE-Zellulose, Mischbettionenaustauscher Serdolit MB, Trypsin: Serva (Heidelberg); DEAE-Sephadex, Ficoll: Pharmacia (Uppsala, Schweden) Agar, Immunseren, Eagle's Trockennährmedium für Gewebekultur: Behringwerke A.G. (Marburg); Cialit: Asid Institut G.m.b.H. (München-Lohof); Dialyseschläuche: Visking Comp. (Chicago); EDTA- (Aethylendiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz), Heparin (Vetren): Promonta G.m.b.H. (Hamburg); Alconox: Alconox Inc. (New York); Kaninchen-Anti-Schafzell-Haemolysin: Coppel Laboratories (Forth Worth, Texas).

2.) Geräte

Ultrazentrifuge L 50 (Rotor Nr. 40, Titanrotor Nr. 50, Swing-out-Rotor SW 39), Spektralphotometer DU: Beckmann (München); Uvicord: LKB-Producter - AB (Stockholm); Christ-Zentrifuge UJ 31, Christ-Tischzentrifuge: Christ (Osterode/Harz); Serva Zentrifuge SS 1 A: Serva (Heidelberg); Cytopherometer: Zeiss (Oberkochen).

3.) Reinigung der Glasgeräte

Die Glaswaren wurden gewaschen und anschließend 12 Stunden in eine 4 %ige Lösung von Alconox in aqua dest. gegeben. Darauf wurde 12 Stunden gewässert, mit aqua dest. gründlich gespült und schließlich bei 200° getrocknet. Pipetten wurden gewaschen, mit Chromschwefelsäure gereinigt und weiter wie die übrigen Glasgeräte behandelt.

4.) Zellelektrophorese

Zur Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Zellen wurde die von Ruhenstroth-Bauer und Mitarbeitern entwickelte und von der Firma Carl Zeiss (Oberkochen) hergestellte Apparatur verwendet (29). Über die Theorie der Zellelektrophorese siehe 30, 31. Die Messung der Zellen erfolgte in der vorderen stationären Ebene der Meßkammer (30, 31). Sie lag bei 0,140 mm der Kammertiefe, die Gesamtkammertiefe betrug 0,694 mm.

Alle Messungen wurden bei 23° in einem Michaelis-Sorbit-Puffer ausgeführt.

Michaelis-Puffer (32 / 33):

A: 1/7 M Natriumacetat + 1/7 M Veronalnatrium in aqua bidest.

B: 0,1 N Salzsäurelösung

C: 50 ml A + 60 ml B + 20 ml 8,5 %ige Natriumchloridlösung
+ 140 ml CO₂ - freies aqua bidest.

Michaelis-Sorbit-Puffer:

4 Vol. 1/3 M Sorbitol + 1 Vol. Michaelispuffer.

Der spezifisch-elektrische Widerstand des Puffers:

$$\varrho = 340 \, \Omega \text{ cm.}$$

Es wurde bei einer 400-fachen Vergrößerung und bei einer Stromstärke $J = 2 \text{ m A}$ gemessen. Mit Hilfe einer Stoppuhr wurde die Zeit bestimmt, die eine Zelle für das Zurücklegen einer Wegstrecke von 0,0097 cm benötigte. Die Feldstärke E wurde aus dem spezifischen Widerstand des Puffers ϱ , dem Kammerquerschnitt q und der Stromstärke J berechnet nach der Formel:

$$E = \frac{\varrho \cdot J}{q} \left[\frac{V}{\text{cm}} \right];$$

5.) Gewebekultur von L - Zellen

L - Zellen (1, 2) wurden in Vierkant-Flaschen bei 37° im Brutschrank gezüchtet. Als Kulturmedium diente eine Mischung, die 80 % Eagle's Nährmedium und 20 % Kälberserum enthielt. Die Zellen wurden 2 mal innerhalb einer Woche auf neue Flaschen übertragen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach Dekantieren des Nährmediums mit 10 ml einer Hanks-Lösung, die 0,06 % Trypsin enthielt, von der Glaswand gelöst, bei 250 g abzentrifugiert und in 20 ml frischem Nährmedium aufgenommen. Je 10 ml der Suspension, die ungefähr $1 - 2 \times 10^6$ Zellen enthielten, wurden in 1 Flasche gegeben. Die Glasgeräte wurden auf übliche Art im Autoklaven keimfrei gemacht.

6.) Vorbereitung von L - Zellen zur Inkubation

L - Zellen dienten in der Regel zur Austestung von Seren und angereicherten Serumfraktionen. Das Nährmedium wurde dekantiert und die Zellen anschließend mit 10 ml einer physiologischen Kochsalzlösung (pH 7,0), die 0,5 % EDTA enthielt, 15 Minuten bei 37° inkubiert. Die auf diese Weise von der Glaswand losgelösten Zellen wurden 3 mal mit je 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. (Christ-Tischzentrifuge, 350 g, 5 Minuten.) 0,5 ml einer Zellaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung, die etwa 1×10^6 Zellen enthielten, wurden mit der zu prüfenden Substanz 30 Minuten bei 37° unter leichtem Schütteln inkubiert.

7.) Vorbereitung der Zellen zur Messung

Ebenso wie L - Zellen wurden alle anderen untersuchten Säugerzellen vor der Inkubation 3 mal mit je 10 ml einer physiologischen Kochsalzlösung gewaschen. Nach der Inkubation erfolgte ein 2 maliges Waschen mit je 10 ml Michaelis-Sorbit-Puffer. Zur Messung wurden die Zellen in 3 ml Michaelis-Sorbit-Puffer aufgeschwemmt. Zu dieser Suspension wurde 1 Tropfen

einer stark verdünnten Suspension von Rattenerythrocyten in Michaelis-Sorbit-Puffer gegeben. Die elektrophoretische Beweglichkeit dieser Erythrocyten schwankt unter konstanten Bedingungen in sehr engen Grenzen (34, 35): In Michaelis-Sorbit-Puffer bei 2 m A beträgt der Mittelwert der elektrophoretischen Beweglichkeit $\bar{x} = 1,897 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ und die Standardabweichung $s = 0,004$. Auf diese Weise konnten störende Einflüsse beim Messen sofort erkannt und vermieden werden.

8.) Zucht und Praeparation anderer Säugetierzellen

HeLa-Zellen (36) und KB-Zellen (37) wurden ebenso wie L - Zellen in Kulturflaschen gezüchtet.

Zajdela - Hepatom - Asciteszellen (38) sowie Yoshida-Ascites-Tumorzellen (39) proliferierten nach Überimpfen auf Sprague-Dawley-Ratten und wurden mit der Ascitesflüssigkeit abgesaugt.

Die Milzen von Mensch, Kaninchen und Ratten wurden mit Hilfe einer Gewebepresse zerkleinert, durch Gaze filtriert und in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Menschliche periphere Leukocyten und Leukämiezellen wurden aus dem Citratblut der Spender durch Schrägsenkung angereichert (40). Citratblut diente auch als Quelle für Erythrocyten der Blutgruppe 0 Rh.

Rattenerythrocyten stammten aus heparinisiertem Rattenblut. Aus dem gleichen Blut wurden Leukocyten nach der Methode von Praetorius (41) angereichert.

Menschliche Knochenmarkzellen stammten aus Gewebeproben des Darmbeinkammes, die nach der Methode von Burkhardt (42) gewonnen wurden.

Knochenmarkzellen von Kaninchen und Ratten wurden aus Femur und Tibia von 6 - 8 Wochen alten Tieren praepariert, mecha-

nisch zerkleinert, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 1 Stunde auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend durch Gaze filtriert.

9.) Auftrennung von L - Zellen durch Zentrifugieren bei einer mit Ficoll erhöhten Dichte (43)

Ficoll ist ein chemisch inertes Polysaccharid vom Molekulargewicht 400 000 und daher im physiologischen Bereich osmotisch praktisch unwirksam. Das Präparat enthält eine nicht genauer definierte Salzkonzentration, die nicht mehr als 1 % beträgt, und wurde daher zunächst mit Hilfe eines Mischbettionenaustauschers Serdolit MB nach folgender Methode entsalzt: 100 ml einer 25 %igen Ficoll-Lösung wurden mit 50 g des Ionenaustauschers etwa 3 Stunden gerührt, bis sich das Ficoll vollständig gelöst hatte. Der Ionenaustauscher wurde anschließend bei 3000 g abzentrifugiert. Die Lösung wurde durch Zugabe von 0,9 g Natriumchlorid isoton gemacht. Sie besitzt die spezifische Dichte $d = 1,085 \text{ g / ml}$. 4 ml dieser Lösung wurden in je ein Gradientenröhrchen des Rotors SW-39 gefüllt und mit 0,5 ml einer Suspension von 3×10^6 L - Zellen in physiologischer Kochsalzlösung überschichtet. Danach wurde 15 Minuten bei 12 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert (Ultra-Zentrifuge, Modell Spinco L). L - Zellen ließen sich auf diese Weise in 2 Fraktionen trennen (Abb. 1). Die obere

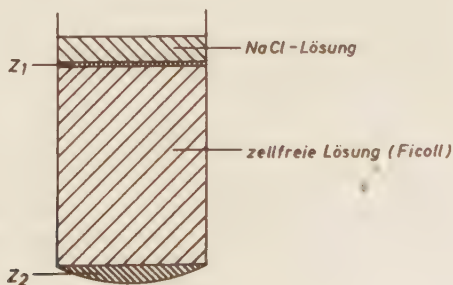


Abb. 1: Auftrennung von L - Zellen in zwei Fraktionen Z_1 und Z_2 nach der Zentrifugation im Gradientenröhrchen.

Zellschicht (Z_1) wurde abgesaugt, die zellfreie Lösung anschließend dekantiert und die untere Zellschicht (Z_2) durch Schütteln mit physiologischer Kochsalzlösung vom Boden des Röhrchens gelöst. Die Zellen wurden anschließend 3 mal mit je 10 ml einer physiologischen Kochsalzlösung gewaschen.

10.) Statistische Untersuchung der zellelektrophoretisch ermittelten Meßwerte

Histogramme wurden durch Klassieren der Meßwerte gewonnen. Die Anzahl der Klassen wurde nach der Regel:

Anzahl der Klassen $n = \sqrt{\text{Anzahl der Meßwerte } x}$ ermittelt. Mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsnetzes (Dr. Becker, Düsseldorf) wurde die Verteilungsform der Meßwerte geprüft (44).

Die Abszisse des verwendeten Netzes ist linear, die Ordinate nach dem Gauß'schen Integral so unterteilt, daß eine symmetrische Gauß'sche Integralkurve in diesem Netz eine Gerade ergibt, wenn die Meßwerte nach folgendem Verfahren eingetragen werden: Die Meßwerte werden bei großem Stichprobenumfang klassiert und ihre prozentuale Summenhäufigkeit im Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen. (Ordinate: prozentuale Summenhäufigkeit, Abszisse: elektrophoretische Beweglichkeit.) Die so gewonnenen Punkte werden durch eine Linie verbunden. Die Kurve ermöglicht in den meisten Fällen das Erkennen einer bestimmten Verteilungsform der Meßwerte. Läßt z.B. der Kurvenverlauf eine Gerade erkennen, wird diese ausgleichend eingezeichnet. Die Abweichungen können dann sofort in Prozent abgelesen werden.

11.) Herkunft der Blute

Es wurde venöses Nativblut von klinisch gesunden Spendern und Kranken mit gesicherten Diagnosen verwendet. Blut von Neugeborenen wurde aus der Nabelschnur entnommen.

12.) Serum

Serum wurde durch Zentrifugieren des Nativblutes während 10 Minuten bei 2000 g von den Zellen getrennt. Das überstehende Serum wurde abpipettiert.

13.) Auftrennung der Serumeiweiße mit Hilfe von Ammoniumsulfat

Frische Seren wurden einzeln auf ihre Membranaktivität geprüft. Die wirksamen Seren wurden bei p H 7,0 und 4° mit Ammoniumsulfat zunächst auf 40 %ige, dann auf 55 %ige Sättigung gebracht. Die Mengen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung, die zum Serum gegeben werden müssen, werden nach folgender Formel berechnet: (45)

$$V = \frac{100 (A - B)}{1 - A} \quad \text{wobei } V \text{ das Volumen einer gesättigten}$$

Ammoniumsulfatlösung in ml ist, das zu 100 ml Serum der Sättigung B gegeben werden muß, um die Sättigung A zu erhalten. Die gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurde unter langsamem Rühren tropfenweise zugegeben. Nachdem die Lösung vollständig zugelaufen war, wurde 1 Stunde bei 4° weiter gerührt. Auf diese Weise wurden zwei Niederschläge gewonnen: die Ammoniumsulfatfällung bei 40 %iger Sättigung wurde Niederschlag A₁ und die bei 55 %iger Sättigung Niederschlag A₂ benannt. Die Niederschläge A₁ bzw. A₂ wurden bei 10 000 g 20 Minuten in der Servall-Zentrifuge abzentrifugiert, in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und 18 Stunden bei 4° gegen Startpuffer (Methodik 14 d) dialysiert.

14.) Chromatographie von A₁ und A₂ an DEAE - Zellulose und DEAE - Sephadex (46, 47)

a.) Regeneration von DEAE - Zellulose und - Sephadex

Je 15 g Trockenpräparat wurden in 2 l aqua bidest. aufgeschwemmt. Die größeren Partikel setzten sich bei 4° ab. Die

im Überstand enthaltenen feinen Partikel wurden abgegossen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der Überstand keine sichtbaren Partikel mehr enthielt. Anschließend wurde mit 0,5 N Natronlauge, aqua bidest. bis zur Neutralisation, 0,5 N Salzsäure und aqua bidest. bis zur Neutralisation gewaschen. Der Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Schließlich wurde mit 10 l Startpuffer gewaschen und die Aufschwemmung mittels Wasserstrahlpumpe evakuiert.

b.) Füllen der Säulen

DEAE - Zellulose wurde unter leichtem Überdruck von 0,2 atü, der mit einer Stickstoff-Flasche erzeugt wurde, in die Säule eingefüllt. DEAE - Sephadex wurde auf einmal eingefüllt. Die Säulendimension betrug in beiden Fällen 2,5 x 80 cm. Eine Glasspirale mit aufgelegter Glaswolle am unteren Ende der Säule verhinderte ein Auslaufen der Ionenaustauscher.

c.) Auftragen der Substanzen

Auf die eben noch feuchte Oberfläche von DEAE-Zellulose wurden 5 ml der gegen Startpuffer dialysierten Ammoniumsulfatfällung A_1 bzw. A_2 mit einer Pipette aufgetragen. In 5 ml waren 0,5 g Protein enthalten. Bei DEAE - Sephadex wurden je 1,5 g Protein in 5,0 ml auf diese Weise aufgetragen.

d.) Elution

Eluiert wurde mit Hilfe eines Puffergradienten steigender Molarität und fallenden pH (48). Der Gradient wurde in Form eines Ansaugsystems hergestellt (Abb. 2).

Der Startpuffer enthält: 0,04 M Tris und 0,005 M H_3PO_4 in
aqua bidest (pH 8,6).

Der Grenzpuffer enthält: 0,35 M Tris und 0,35 M H_3PO_4 in
aqua bidest (pH 3,9).

Menge des Startpuffers: 600 ml. Im Ansauggefäß wurden Startpuffer und angesaugter Grenzpuffer durch Rühren vermischt. Es wurde mit 40 ml/Stunde eluiert. Das Volumen regelte eine Schlauchdruckpumpe. Die einzelnen aufgefangenen Fraktionen betrugen 10 ml.

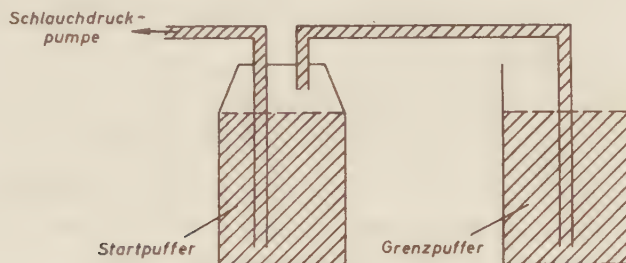


Abb. 2: Puffer-Gradientenmischgefäß

e.) Extinktion

Der Verlauf der Proteinkonzentration im Eluat wurde durch Messung der Extinktion bei $256 \text{ m}\mu$ im Uvicord bestimmt und graphisch dargestellt.

f.) Einengung

Die Fraktionen wurden dem Extinktionsverlauf entsprechend vereinigt, in Dialyseschläuche abgefüllt und im Vakuumgefäß durch Unterdruck mittels Wasserstrahlpumpe auf die gewünschte Konzentration eingengt.

15.) Herstellung einer lipoidfreien Fraktion (49)

Die Entfernung der Lipoproteide erfolgte durch Flotation bei der Dichte $d = 1,200 \text{ g / ml}$ in der Ultrazentrifuge: Mischserum + Cialit (10 000 : 1) + EDTA (Endkonzentration 5 mg/100 ml)

+ Kaliumbromid (28,58 g / 100 ml). Es wurde 39 Stunden bei 39 000 Umdrehungen / Minute zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Modell Spinco L, Rotor Nr. 40). Die oberen 2 ml jedes Röhrchens wurden abpipettiert und verworfen, der Unterstand 20 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert.

16.) Proteinbestimmung nach Folin - Ciocalteu (50, 51, 52)

a.) Reagentien:

A: 2 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH

B: 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 1 %iger Natriumcitratlösung.

C: 1 ml B + 50 ml A

D: Folin-Ciocalteu-Reagens. Das Reagens wird mit 1 N · NaOH und Phenolphthalein titriert und mit Wasser auf eine 1 N Lösung gebracht. (1 Vol. Reagens Merck + 2 Vol. H_2O .)

b.) Verfahren

0,1 bis 1 ml einer Probe, die 10 - 100 μg Eiweiß enthält, werden mit aqua bidest. auf 1 ml ergänzt, mit 5 ml der Lösung C versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen. Dann werden 0,5 ml Reagens D schnell in die Mischung pipettiert. Es wird sorgfältig gemischt und nach 30 Minuten bis zu 2 Stunden die Extinktion bei 750 m μ gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Eichkurve ermittelt, die mit Hilfe von Proteinlösungen genau definierten Proteingehaltes (10,50 und 100 μg Albumin) aufgestellt wird.

17.) Immunelektrophorese (53 / 54)

a.) Puffer: A: 117,68 g Na - Veronal

77,68 g Na - Acetat

und 100,00 mg Cialit werden in 1 l aqua bidest. gelöst.

B: (Stammpuffer)

200 ml A + 1560 ml aqua bidest. + 280 ml N/10 HCl

C: (Gebrauchspuffer zur Kammerfüllung)

2 Vol. Stammpuffer + 1 Vol. aqua bidest.
+ Cialit

D: (Gebrauchspuffer für Agar)

1 Vol. Stammpuffer + 2 Vol. aqua bidest.

b.) Agar: 2 g Reinagar (Behringwerke) in 100 ml Puffer werden erhitzt, bis keine Luftblasen mehr hochsteigen.

c.) Antiseren: Antihumanserum und Anti - γ G -Globulinserum

d.) Färbelösung: 0,4 %ige Lösung von Azokarmin
in Methanol / Eisessig (Verhältnis 9 : 1)

e.) Methode: Der erhitzte Agar wird gleichmäßig auf die gründlich gereinigten Objektträger aufgetragen. Nach 10 Minuten Abkühlungszeit werden Löcher und Schlitzte vorgestanzt. Der Agar in den Löchern wird mittels Wasserstrahlpumpe und einer Glaskanüle abgesaugt. Das Antigen wird in die Löcher pipettiert. 90 Minuten lang wird bei einer Stromstärke $J = 4,5 \text{ mA}$ /Objektträger das Antigen elektrophoretisch getrennt. Nach der Elektrophorese wird der vorgestanzte Schlitz mit einer Kanüle ausgehoben. Die entsprechenden Immunsereen werden eingefüllt und diffundieren 24 - 36 Stunden in einer feuchten Kammer. Nach Waschen der Agarplättchen wird 15 Minuten in der Färbelösung gefärbt.

18.) Untersuchung der Fraktionen auf Komplementgehalt (55)

Die Untersuchung erfolgte im hämolytischen System (Schaferythrocyten, Hämolsin gegen Schaferythrocyten von immunisierten Kaninchen): Schaferythrocyten wurden 4 mal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen und mit einem Natriumveronapuffer (56, 57) (pH 7,4) so verdünnt, daß 1 cmm der Suspension 10^6

Erythrocyten enthielt. Hämolysin (Rabbit-anti-sheep-cell-hemolysin, Coppel Laboratories, Forth Worth, Texas), das mit dem gleichen Puffer 1 : 400 verdünnt worden war, wurde im Verhältnis 1 : 1 zu der Suspension gegeben. Die Mischung wurde 30 Minuten bei 37° inkubiert. Die Fraktionen, die 8 g % Protein enthielten, wurden mit Natriumveronalpuffer 1 : 32, 1 : 16 und 1 : 8 verdünnt und je 1 Tropfen pro Testansatz zugegeben. Im Testansatz befanden sich 0,1 ml sensibilisierte Schafererythrocyten und 0,5 ml Natriumveronalpuffer. Der Grad der Hämolyse wurde photometrisch bei 750 mμ bestimmt. Die Untersuchung von Seren auf Komplementaktivität, die mit EDTA behandelt worden waren, erfolgte im gleichen System, nachdem der Natriumveronalpuffer ebenfalls mit EDTA von Mg^{++} und Ca^{++} Ionen befreit worden war.

19.) Bestimmung der Anheftungsrate von L-Zellen in der Kultur

L - Zellen, die sich nicht an die Wand der Kulturflaschen angeheftet hatten, wurden mit dem Nährmedium abgegossen, abzentrifugiert und in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Erst dann wurden die Zellen, die sich an der Wand angeheftet hatten, auf die unter Methodik Nr. 5 beschriebene Weise von der Wand gelöst, abzentrifugiert und ebenfalls in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Es wurde gut geschüttelt und anschließend das Verhältnis der Zellen im Nährmedium zu denen, die sich angeheftet hatten, in der Zählkammer nach Bürker bestimmt.

Ergebnisse

A: Der Einfluß von frischem Humanserum auf das Membranpotential verschiedener Säugetierzellen

1.) Versuch:

Eine Suspension von $1,5 \times 10^6$ L-Zellen in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde mit 0,5 ml eines frischen menschlichen Serums 30 Minuten bei 37° inkubiert. Als Kontrollansatz dienten L-Zellen in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung. Nach der Inkubation wurden die Zellen zellelektrophoretisch untersucht.

Ergebnis:

Die mit physiologischer Kochsalzlösung inkubierten L-Zellen streuen in einem konstanten Bereich um einen bestimmten Mittelwert der elektrophoretischen Beweglichkeit (Tab. 1 und Abb. 3 a). Die Zellen, die mit menschlichem Serum behandelt wurden, zeigen eine deutliche Verringerung ihres negativen Membranpotentials. In vielen Fällen wird eine wesentlich **breitere** Streuung der ermittelten Werte gefunden (Abb. 3 b). In den Fällen, in denen keine wesentlich verbreiterte Streuung nach der Inkubation mit Humanserum beobachtet wurde, war die elektrophoretische Beweglichkeit der L-Zellen sehr stark verringert (Abb. 3 c).

2. Versuch:

Da die in Abb. 3 c wiedergegebene Verteilung der Meßwerte nur bei der Austestung bestimmter Seren auftrat, wurden solche Seren mit physiologischer Kochsalzlösung in einer Reihe verdünnt und anschließend mit L-Zellen inkubiert.

Ergebnis:

Mit zunehmender Verdünnung des Serums nimmt die elektrophore-

tische Beweglichkeit der Zellen zu und nähert sich den Werten unbehandelter Zellen. Dabei wird bei der Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 2 ein Histogramm beobachtet, wie es in Abb. 3 b dargestellt ist. Die Form der Histogramme ist also von der Konzentration bestimmter Stoffe im Serum abhängig.

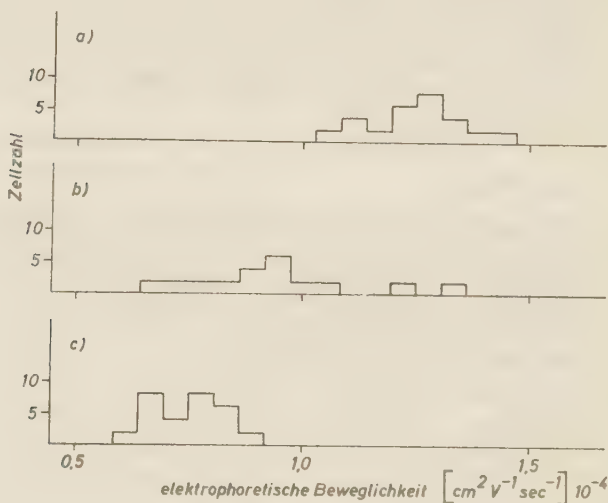


Abb. 3: Zytopherogramme von L - Zellen nach 30 minütiger Inkubation bei 37° mit

- a) physiologischer Kochsalzlösung,
- b) einem mittelstark membranaktiven Serum,
- c) einem stark membranaktiven Serum.

3. Versuch:

Es schien möglich, daß nur bestimmte L - Zellen von Humanserum in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit verändert wurden, da auch bei einzelnen mit Serum behandelten L - Zellen

die Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet wird, die unbehandelte Zellen aufweisen. Aus diesem Grunde wurden L - Zellen durch Zentrifugieren bei erhöhter Dichte in zwei Fraktionen Z_1 und Z_2 getrennt (Methodik Nr. 9), mit je 1 ml frischem menschlichen Humanserum inkubiert und ihre Wanderungsgeschwindigkeit bestimmt.

Ergebnis:

Wie Abb. 4 zeigt, werden beide Zellfraktionen in gleicher Weise vom Humanserum beeinflusst.



Abb. 4: Zytopherogramme von L - Zellen, die durch Zentrifugieren bei erhöhter Dichte in zwei Fraktionen Z_1 und Z_2 getrennt worden waren und anschließend mit membranaktivem Serum 30 Minuten bei 37° inkubiert wurden.

4. Versuch:

Um weiter auszuschließen, daß nur bestimmte Zellpopulationen, deren Merkmal nicht das spezifische Gewicht der Zellen darstellt, in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit zu beeinflussen sind, wurden etwa je 700 Meßwerte von L - Zellen, die

in physiologischer Kochsalzlösung bzw. Humanserum inkubiert worden waren, auf die unter Methodik Nr. 10 angegebene Art und Weise in das Wahrscheinlichkeitsnetz eingetragen.

Ergebnis:

In beiden Fällen erhält man symmetrische Gaußverteilungen (Abb. 5). Die Mittelwerte der elektrophoretischen Beweglichkeit von L-Zellen, die mit physiologischer Kochsalzlösung

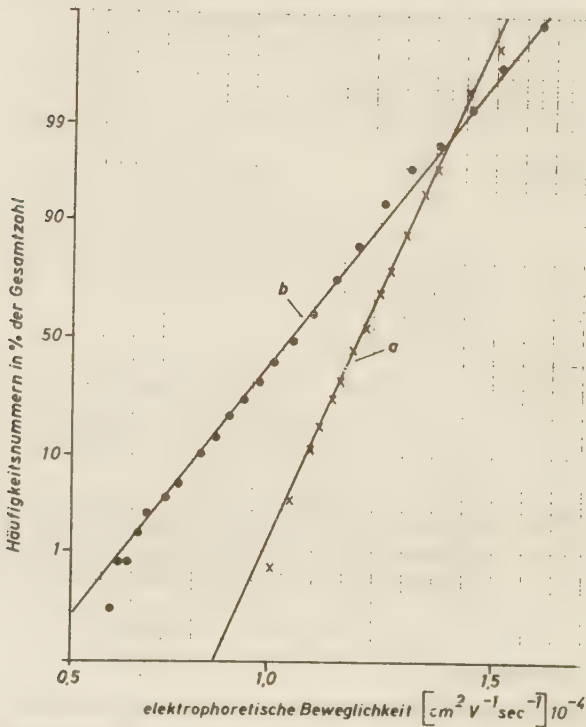


Abb. 5: Summenhäufigkeit von L - Zellen nach Inkubation in
a) physiologischer Kochsalzlösung,
b) Humanserum
im Wahrscheinlichkeitsnetz. Stichprobenumfang je 700
Meßwerte.

bzw. Humanserum inkubiert wurden, sind beim Schnittpunkt der ausgleichenden Geraden mit 50 % der Ordinate abzulesen; sie sind deutlich voneinander getrennt. Die stärkere Neigung der Geraden b gibt die breitere Streuung der Werte wieder.

5. Versuch:

Ebenso wie L - Zellen wurden die anderen in Tab. 1 aufgeführten Säugetierzellen mit frischem menschlichem Serum inkubiert.

Ergebnis:

Die elektrophoretische Beweglichkeit der roten und weißen Blutzellen vom Menschen (Blutgruppe O Rh) und der Ratte wird nach Behandlung mit Humanserum nicht verändert. Alle anderen in der Tabelle 1 angeführten Säugetierzellen verringern nach der Inkubation ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Die Mittelwerte ($\bar{x}$) der Werte und ihre Standardabweichung, (s) in Tab. 1, wurden in jeweils mindestens 4 Versuchen, in denen je 30 Zellen gemessen wurden, ermittelt.

Tab. 1

Elektrophoretische Beweglichkeit $\times 10^{-4} (\text{cm}^2 \text{v}^{-1} \text{sec}^{-1})$
 verschiedener Säugetierzellen nach Inkubation mit
 Physiол. NaCl.-Lösung aktivem Humanserum

Adsorption von Hu-
manserum an die ge-
nannten Zellarten
und anschließende
Austestung dieses
Serums an L-Zellen

Zellart	M	s	M	s	M
L-Zellen	1,228	0,108	0,954	0,142	M = 1,116
HeLa-Zellen	1,184	0,098	0,956	0,105	1,123
KB-Zellen	1,141	0,098	1,005	0,135	-----
Rattenerythrocyten	1,897	0,004	1,897	0,008	0,823
Rattenmilzzellen	1,543	0,111	1,371	0,168	1,114
Rattenknochenmarkzellen	1,521	0,112	1,199	0,257	-----
Rattenasciteszellen (Yoshida)	1,710	0,079	1,014	0,079	1,217
Rattenascites-Leberzellen (Zajdela)	1,654	0,160	1,141	0,171	1,276
Kaninchenerythrocyten	0,913	0,013	0,913	0,014	0,729
Kaninchensemilzzellen	1,440	0,119	0,884	0,093	1,194
Kaninchenknochenmarkzellen	1,255	0,213	0,970	0,069	1,201
Humanerythrocyten	1,868	0,017	1,868	0,022	0,957
Humanblutleukocyten	1,465	0,085	1,467	0,096	0,800
Humanknochenmarkzellen	1,543	0,103	1,164	0,278	1,143
menschl. Leukämiezellen (myeloische Leukämie)	1,629	0,075	1,605	0,088	0,836

Tab. 1: Einfluß von Humanserum auf die elektrophoretische Beweglichkeit ($\text{cm}^2 \text{v}^{-1} \text{sec}^{-1}$) $\cdot 10^{-4}$ vor-
 verschiedenen Säugetierzellen. 106 Zellen wurden jeweils 30 Minuten bei 37° inkubiert. Die
 Adsorption des Humanserums erfolgte bei 0° und 37° an jeweils 3×10^7 Zellen.

B: Charakterisierung der für den Membraneffekt verantwortlichen Serumwirkung

1. Versuch:

Außer menschlichen Seren wurden Seren von Kaninchen, Ratten, Kälbern, Meerschweinchen und Mäusen auf L - Zellen und Zajdela-Hepatom-Ascites-Zellen ausgetestet.

Ergebnis:

95 % von über 100 untersuchten Humanserem zeigen die beschriebene Wirkung auf die elektrophoretische Beweglichkeit der Zellen. Bei menschlichen Seren, die keine Wirkung zeigen, läßt sich keine Abhängigkeit von Geschlecht, Gesundheitszustand, Blutgruppenzugehörigkeit (A B O) oder Rhesusfaktor nachweisen. Auch die Seren von Kranken, bei denen maligne Blastome mit Metastasen diagnostiziert waren, verlangsamten die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen. Nabelschnurseren und Seren von 3 - 6 Wochen alten Säuglingen besitzen diese Wirkung jedoch nicht, obwohl das entsprechende mütterliche Serum membranaktiv ist. Diese membranaktive Eigenschaft wird demnach erst im nachuterinen Leben erworben.

Außer Humanserum verlangsamten 3 von 6 ausgetesteten Kaninchenserem die Wanderungsgeschwindigkeit von L - und Zajdela-Hepatom-Ascites-Zellen; die Seren vom Kalb, Meerschweinchen, von der Ratte und Maus sind dagegen inaktiv.

2. Versuch:

Humanserem wurden erhitzt oder eine Woche bei 4° C aufbewahrt oder auf -30° eingefroren und anschließend bei 37° und 0° mit L - Zellen inkubiert.

Ergebnis:

Werden menschliche Seren 20 Minuten auf 56° erhitzt, verlieren sie ihre membranaktive Eigenschaft. Diese Eigenschaft ver-

schwindet auch, wenn man aktives Serum mehrere Tage bei 4° aufbewahrt, bleibt aber über mehrere Wochen erhalten, wenn das Serum auf -30° eingefroren wird. Werden L - Zellen bei 0° mit Serum inkubiert, zeigt sich keine Verminderung ihres negativen Oberflächenpotentials. Dieser letzte Befund ließ an eine enzymatische Wirkung denken, die jedoch durch die folgenden zwei Versuche unwahrscheinlich gemacht werden konnte:

3. Versuch:

Außer KB- und Rattenknochenmarkzellen wurden von den in Tab. aufgeführten Zelltypen je 3×10^7 Zellen in 1 ml Serum bei 37° und 0° inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation abzentrifugiert und das oberstehende Serum mit neu gewonnenen Zellen inkubiert, welche sich durch frisches menschliches Serum in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit beeinflussen lassen, wie z.B. L - Zellen und Zajdela-Hepatom-Ascites-Zellen.

Ergebnis:

Alle Zellen, die durch Humanserum eine Verminderung ihres Membranpotentials erfahren, sind in der Lage, diese Serum-eigenschaft sowohl bei 0° als auch bei 37° zu erschöpfen (Tab. 1). Die Seren, die mit peripheren Blutzellen von Mensch und Ratte, also Zellen, die durch Humanserum nicht in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit beeinflusst werden, inkubiert wurden, vermindern dagegen bei anschließender Inkubation mit L - Zellen das Oberflächenpotential dieser Zellen.

4. Versuch:

L - Zellen wurden nach der Inkubation mit frischem menschlichem Serum bis zu 6 mal mit physiologischer Kochsalzlösung und Michaelis-Sorbit-Puffer gewaschen.

Ergebnis:

Die Veränderung des Membranpotentials durch Humanserum ist reversibel. Wäscht man nämlich die veränderten L - Zellen 2 mal mit je 10 ml physiologischer Kochsalzlösung, so zeigen diese L - Zellen die Wanderungsgeschwindigkeit unbehandelter Zellen. Das Waschen mit einem Michaelis-Sorbit-Puffer, der durch eine niedrigere Ionenstärke gekennzeichnet ist, führt erst nach 6 maligem Waschen mit je 10 ml zum gleichen Ergebnis.

C: Anreicherung der für die Beeinflussung des Membranpotentials verantwortlichen Serumfaktoren

1. Versuch:

Humanserum wurde mit Ammoniumsulfat auf 40 %ige Sättigung und nach Abzentrifugieren des Niederschlages A_1 auf 55 %ige Sättigung gebracht. Beide Niederschläge A_1 und A_2 wurden gegen Startpuffer dialysiert und an L - Zellen ausgetestet. Die Proteinkonzentration betrug 30 g % je Testansatz.

Ergebnis:

A_1 ist im Test stark membranaktiv. A_2 zeigt keine Wirkung auf die elektrophoretische Beweglichkeit von L - Zellen.

2. Versuch:

0,5 bzw. 1,5 g Protein der Niederschläge A_1 und A_2 wurden anschließend über DEAE - Zellulose bzw. DEAE - Sephadex chromatographiert (Methodik Nr. 14). Die gewonnenen Fraktionen (Abb. 6) wurden eingeengt und anschließend einzeln und kombiniert ausgetestet. Der Proteingehalt / Testansatz betrug 5 - 10 g %.

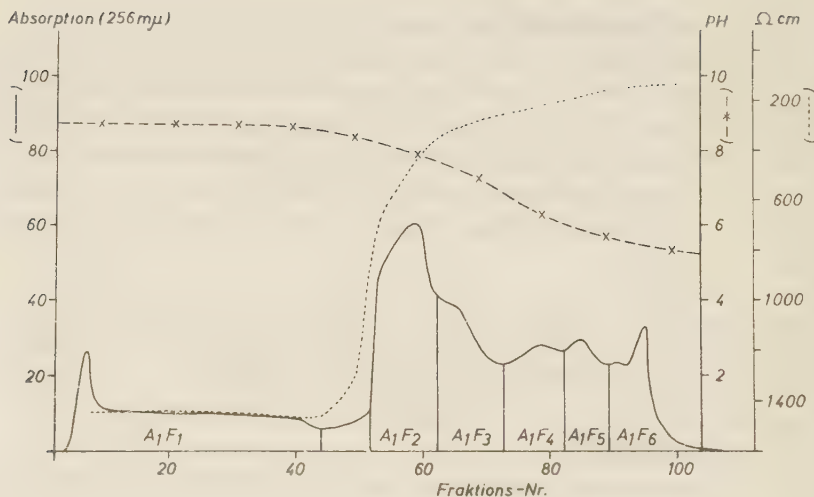


Abb. 6: Chromatographie von A₁ über DEAE - Sephadex.
 x---x: Änderung des pH' des Elutionsgradienten.
 o...o: Änderung der Ionenstärke des Elutionsgradienten.
 Startpuffer: 0,04 M Tris; 0,005 M H₃PO₄ (pH 8,6)
 Grenzpuffer: 0,35 M Tris; 0,35 M H₃PO₄ (pH 3,9).

Ergebnis:

Bei der Chromatographie erhält man mehrere Gipfel (Abb. 6), denen bestimmte Fraktionen zugeordnet werden. In der mit A₁F₂ bezeichneten Fraktion findet man die ursprüngliche Aktivität wieder. Die Fraktionen A₁F₁, A₁F₃, A₁F₄, A₁F₅ und A₁F₆ sind, für sich allein an L - Zellen ausgetestet, unwirksam (Tab. 2). Wie aus Tab. 2 hervorgeht, ergibt aber die Kombination der inaktiven Fraktion A₁F₁ mit dem Niederschlag der Ammoniumsulfatlösung A₂ wieder volle Aktivität. Es muß sich dabei

Tab. 2

Fraktionen	Elektrophoret. Beweglichkeit der inkubierten L-Zellen $10^{-4} \text{ (cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1})$
$A_1 : 0 - 40 \% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,941
$A_2 : 40 - 55 \% (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,121
A_1F_1	1,115
A_1F_2	0,949
$A_1F_3 + A_1F_4 + A_1F_5 + A_1F_6$	1,114
A_2F_1	1,120
$A_2F_2 + A_2F_3 + A_2F_4 + A_2F_5$	1,116
$A_1F_1 + A_2$	0,971
$A_1F_1 + A_2F_1$	0,960
$A_1F_1 + (A_2F_2 + A_2F_3 + A_2F_4 + A_2F_5)$	1,115
$A_1F_1 + (A_1F_3 + A_1F_4 + A_1F_5 + A_1F_6)$	1,120
$A_1F_3, 4, 5, 6 + A_2F_2, 3, 4, 5$	1,114
$A_1F_1 + A_2$ (lipoproteid-frei)	0,952
$A_1F_1 + \text{Nabelschnurserum}$	0,963
$A_2F_1 + \text{Nabelschnurserum}$	1,117
Nabelschnurserum	1,117

Tab. 2: Einfluß verschiedener gereinigter Fraktionen des Humanserums auf die elektrophoretische Beweglichkeit von L - Zellen.

um zwei verschiedene Faktoren handeln, die zur Wirksamkeit führen: Testet man nämlich A_1F_1 und A_2 einzeln jeweils in der doppelten Proteinkonzentration wie bei der Kombination beider Komponenten aus, ergibt sich keine Aktivität.

Bei der Chromatographie von A_2 erhält man ebenfalls mehrere Gipfel. Die Fraktionen wurden A_2F_1 , A_2F_2 , A_2F_3 , A_2F_4 und A_2F_5 benannt. Abb. 7. Die Kombination der Fraktion A_2F_1 mit A_1F_1 verringert im Test die elektrophoretische Beweglichkeit. Alle anderen möglichen Kombinationen sind dagegen wirkungslos (Tab. 2).

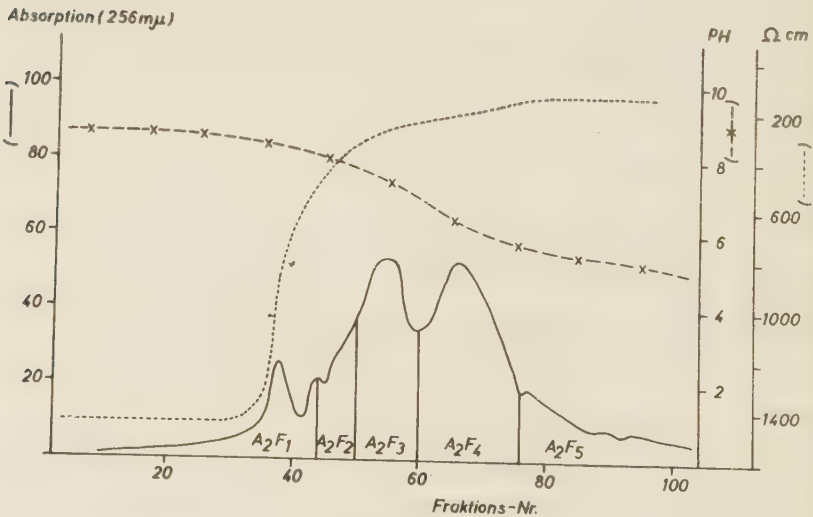


Abb. 7: Chromatographie von A_2 über DEAE - Sephadex.
Bedingungen wie bei Abb. 6.

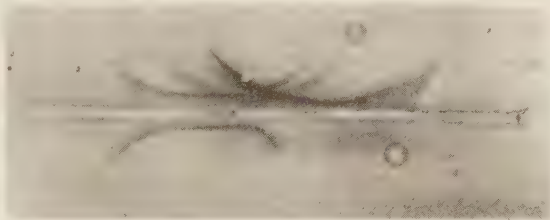
3. Versuch:

Der Reinheitsgrad der Fraktionen A_1F_1 und A_2F_1 wurde immunoelektrophoretisch untersucht. Als Antiserum wurde Anti-human-Serum und Anti - γ G-Globulin-Serum verwendet (Methodik Nr. 17).

Ergebnis:

Bei der Fraktion A_1F_1 handelt es sich um ein immunelektrophoretisch reines γ G-Globulin; die Bande konnte mit Hilfe von Anti - γ G-Globulin-Serum identifiziert werden (Abb. 8).

a)



b)

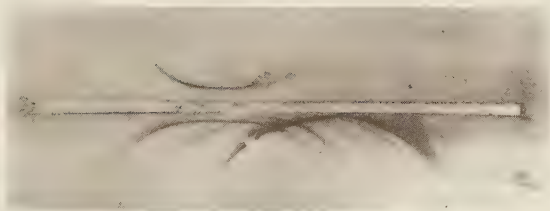


Abb. 8: Immunelektrophorese von A_1F_1 und A_2F_1 .

a) A_1F_1 : Antihumanserum

b) A_2F_1 : Antihumanserum.

Die Fraktion A_2F_1 enthält eine deutliche Bande im G-Globulin-Bereich, daneben war in einigen Versuchen noch eine undeutete 2. Bande im Bereich der Proteinauftragungsstelle zu beobachten. Diese Bande ist einem β -Globulin zuzuordnen (58).

4. Versuch:

Um auszuschließen, daß der wirksame Faktor in A_2F_1 ein Lipoproteid ist, wurden die Lipoproteide durch Flotation bei erhöhter Dichte (Methodik Nr. 15) entfernt. Die lipoidfreie Fraktion wurde zusammen mit A_1F_1 auf L - Zellen ausgetestet.

Ergebnis:

A_1F_1 kombiniert mit der lipoidfreien Fraktion verlangsamt die elektrophoretische Beweglichkeit von L - Zellen (Tab. 2).

Die folgenden drei Versuche bestätigten, daß zwei Faktoren für die Änderung des Membranpotentials verantwortlich sein müssen.

5. Versuch:

Zu je einem Testansatz von 10^6 L - Zellen in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung wurden 1 ml der Fraktion A_1F_1 und 1 ml Nabelschnurserum bzw. 1 ml A_2F_1 und 1 ml Nabelschnurserum gegeben.

Ergebnis:

Die Kombination der Fraktion A_1F_1 mit Nabelschnurserum verringert die Wanderungsgeschwindigkeit von L - Zellen, während Nabelschnurserum kombiniert mit A_2F_1 unwirksam ist. Nabelschnurserum enthält also den in A_2F_1 enthaltenen Faktor (Tab. 2).

6. Versuch:

Wie bereits angeführt geht die Membranwirksamkeit eines frischen Humanserums verloren, wenn man es vorher bei 0° an

einen Überschuß von L - Zellen adsorbiert. 1 ml eines auf diese Weise unwirksam gemachten Serums wurde sowohl mit der Fraktion A_1F_1 als auch mit A_2F_1 auf L - Zellen ausgetestet.

Ergebnis:

Die Mischung A_1F_1 mit einem durch Adsorption bei 0° inaktivierten Serum verringert die elektrophoretische Beweglichkeit von L - Zellen, während die Fraktion A_2F_1 zusammen mit diesem Serum keine Wirkung zeigt. Der Faktor aus A_2F_1 wird also nicht bei 0° adsorbiert. Erst durch das Zusammenspiel von A_1F_1 und A_2F_1 wird bei 37° das Membranpotential der Zellen beeinflusst.

7. Versuch:

a.) L - Zellen wurden zunächst mit A_1F_1 bei 37° 30 Minuten inkubiert, dann 2 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, mit A_2F_1 erneut inkubiert, 2 mal mit Michaelis-Sorbit-Puffer gewaschen und ausgetestet.

b.) In einem weiteren Versuchsansatz wurden vor dem Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung die L - Zellen mit A_2F_1 inkubiert, dann mit A_1F_1 und anschließend mit Michaelis-Sorbit-Puffer gewaschen.

Ergebnis:

Im Versuchsansatz a) wandern die Zellen langsamer. Im Versuchsansatz b) zeigt sich keine Wirkung. Das bedeutet, daß der Faktor in A_1F_1 durch 2 maliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung nicht abwaschbar ist. Nach Ergebnis Teil B Nr. 4 wird demnach die Wirkung des Faktors in A_2F_1 durch Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung unwirksam gemacht. Versuch 7 b läßt die Möglichkeiten der Deutung zu, daß entweder die Komponente in A_2F_1 ohne Anwesenheit von A_1F_1 bei 37° nicht gebunden werden kann oder eine Bindung an die Membran

durch das Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung gelöst wird.

D: Zur Frage der Komplementbeteiligung bei der Membranwirkung von Humanserum

Die Art des Einwirkens der beiden Faktoren aus dem Humanserum, insbesondere die Art der Adsorption an Zellen, erinnert an das Antikörper-Komplement-System.

Deshalb wurden einige Versuche unternommen, die klären sollten, ob die Eigenschaft des Humanserums bzw. der Fraktionen A_1F_1 und A_2F_1 , die elektrophoretische Beweglichkeit von bestimmten Säugetierzellen zu verringern, an das Vorhandensein von aktivem Komplement gebunden ist.

1. Versuch:

Sowohl A_1F_1 als auch A_2F_1 wurde im Wasserbad 30 Minuten auf 56° erhitzt. Erhitztes A_1F_1 wurde mit nicht erhitztem A_2F_1 , erhitztes A_2F_1 mit nicht erhitztem A_1F_1 kombiniert. Die Kombinationen wurden an L - Zellen ausgetestet.

Ergebnis:

In keinem Fall ist die elektrophoretische Beweglichkeit von L - Zellen verlangsamt. Die in A_1F_1 und A_2F_1 enthaltenen Faktoren sind also beide hitzelabil.

2. Versuch:

Menschliches Komplement ist nur dann wirksam, wenn eine bestimmte Konzentration von Magnesiumionen und Kalziumionen vorhanden ist (59). Magnesium- und Kalziumionen werden durch Chelatbindung mit Hilfe von EDTA unwirksam:

Frisches Serum wurde

- a: auf eine Konzentration von 1/200 M EDTA gebracht,
- b: anschließend gegen einen 1000 fachen Überschuß an physiologischer Kochsalzlösung 18 Stunden dialysiert,
- c: erneut auf 1/200 M EDTA gebracht,
- d: nochmals gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert.

Je 1 ml der Seren der Versuchsansätze a, b, c, d wurde auf die Membranaktivität gegenüber L - Zellen geprüft. In zwei weiteren Ansätzen wurden die Seren a und c jeweils auf 1/100 M Magnesiumacetat und Kalziumchlorid gebracht und mit L - Zellen inkubiert.

Ergebnis:

Die Seren der Versuchsansätze a und c waren nicht membranaktiv, die der Ansätze b und d zeigten dagegen volle Wirksamkeit. Das bedeutet, daß die Ionenbindung durch EDTA nicht entscheidend für den Aktivitätsverlust der Seren a und c sein kann. Die Zugabe von Magnesiumacetat und Kalziumchlorid zu a und c führte wieder zu Aktivität.

3. Versuch:

Um auszuschließen, daß doch noch geringe Spuren von Mg^{++} und Ca^{++} nach der Dialyse wirksam sein könnten, wurden die Seren a, b, c, d in einem Mg^{++} und Ca^{++} -freien Puffer im hämolytischen System auf Komplementaktivität geprüft.

Ergebnis:

Die Seren a und b sind im Komplementfixationstest noch wirksam, in den Seren c und d läßt sich keine Komplementwirksamkeit nachweisen (Tab. 3).

4. Versuch:

Zu den Fraktionen A_1F_1 und A_2F_1 wurde je 1 ml aktives Meer-schweinchenkomplement (Behringwerke) gegeben. In diesen An-

sätzen wurden L - Zellen 30 Minuten bei 37° inkubiert und anschließend zellelektrophoretisch untersucht.

Ergebnis:

Meerschweinchenkomplement kann weder den in A_1F_1 noch den in A_2F_1 enthaltenen Faktor ersetzen.

Tab. 3

Untersuchtes Serum	Hämolyse	Membranaktivität
Unbehandeltes Serum	17,5 %	++
Serum 24 Stunden gegen NaCl dialy- siert	10 %	++
A: Serum $\frac{1}{200}$ M EDTA	22 %	-
B: Serum A 24 Stun- den gegen NaCl dialysiert	7,5 %	++
C: Serum B $\frac{1}{200}$ M EDTA	0 %	-
D: Serum C 24 Stun- den gegen NaCl dialysiert	1,5 %	++
Sensibilisierte Schafererythrocyten ohne Serum	0,5 %	

Tab. 3: Vergleich der Komplementaktivität im hämolytischen System und der Membranaktivität im zellelektrophoretischen Test von membranaktiven Seren, die mit EDTA behandelt wurden.

5. Versuch:

Die Fraktionen A_1F_1 und A_2F_1 wurden einzeln und zusammen auf Komplementaktivität untersucht (Methodik Nr. 18).

Ergebnis:

Der sehr empfindliche Komplementfixationstest zeigt keine Komplementbindung an sensibilisierte Schaferythrocyten aus den Fraktionen A_1F_1 und A_2F_1 . Auch bei der Kombination A_1F_1 und A_2F_1 , die die Oberflächenladung von Zellen verändert, wird keine Komplementaktivität beobachtet (Tab. 4).

Tab. 4

Ausgetestete Fraktionen	Hämolytische Aktivität im Komplementsystem
Humanserum	+++
A_1F_1	-
A_2F_1	-
$A_1F_1 + A_2F_1$	-

Tab. 4: Prüfung einzelner und kombinierter Fraktionen auf Komplementaktivität.

E: Der Einfluß der Fraktionen A_1F_1 und A_2F_1 auf das Wachstum der L - Zellen in der Gewebekultur

Versuch:

Da Saxén und Mitarbeiter beobachten konnten, daß frisches menschliches Serum das Anheften von L - Zellen an die Glas-

wand der Kulturflaschen verhindert, wurden die gereinigten Fraktionen nach der Chromatographie sowie frisches Humanserum auf folgende Weise zum Kulturmedium zugesetzt: An Stelle des wachstumsfördernden Kälberserums wurde

a: physiologische Kochsalzlösung,

b: die durch Chromatographie gewonnenen Fraktionen des Humanserums (Tab. 5) und

c: Humanserum

zum Eagle-Nährmedium zugesetzt, nachdem die Zellen auf neue Flaschen übertragen worden waren. Der Proteingehalt der gereinigten Fraktionen betrug wie der des Humanserums 8g%. a, b und c wurden zum Eagle-Medium jeweils im Verhältnis 1 : 4 zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden die in der Nährlösung schwimmenden und an der Wand befindlichen, durch Trypsinierung gelösten Zellen getrennt ausgezählt.

Ergebnis:

Wie Tab. 5 zeigt, beträgt das Verhältnis der Zellen im Normal-Medium zu den an der Wand angehefteten Zellen im Durchschnitt 0,5 : 10, nach Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung 10 : 10. Die zugesetzten Fraktionen, die isotonisch waren und auf p H 7,0 eingestellt worden waren, verhindern, wenn auch in unterschiedlichem Maße, das Anheften der Zellen an die Glaswand. Gleichzeitig wird ein Klumpen der im Nährmedium befindlichen Zellen beobachtet.

Tab. 5

Zugesetzte Fraktionen	Verhältnis der Zellen im Kulturmedium zu den Zellen an der Glaswand
Kälberserum	0,5 : 10
NaCl	10 : 10
Humanserum	150 : 10
A ₁	230 : 10
A ₂	20 : 10
A ₁ F ₁	34 : 10
A ₁ F ₂	100 : 10
A ₁ F ₃	410 : 10
A ₁ F ₄	120 : 10
A ₁ F ₅	90 : 10
A ₁ F ₆	70 : 10
A ₂ F ₁	150 : 10
A ₂ F ₂	100 : 10
A ₂ F ₃	24 : 10
A ₂ F ₄	30 : 10
A ₂ F ₅	43 : 10

Tab. 5: Einfluß verschiedener Humanserumfraktionen auf das Wachstum von L - Zellen. Medium: 8 ml Eagle-Nährmedium + 2 ml auszutestende Fraktion. Inkubationsdauer: 24 Stunden. Die in der Nährlösung schwimmenden und die an der Glaswand haftenden Zellen wurden getrennt ausgezählt und das Verhältnis ermittelt.

Besprechung

Frisches Humanserum erniedrigt das negative Membranpotential von verschiedenen Säugetierzellen, das durch Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit erfaßt werden kann. Wie Sinclair und Bishop (60) zeigten, ist es möglich, L - Zellen mit Hilfe eines Zellgradienten zu synchronisieren. Das aber bedeutet, daß L - Zellen, die sich in einem bestimmten Stadium ihres Teilungsrythmus' befinden, ein für dieses Stadium charakteristisches spezifisches Gewicht besitzen. Da zwei Populationen von L - Zellen, die durch Zentrifugieren bei erhöhter Dichte gewonnen werden konnten, in gleicher Weise von Humanserum beeinflußt werden, ist es unwahrscheinlich, daß L - Zellen, die sich in einem bestimmten Stadium ihres Teilungsrythmus' befinden - der Teilungsrythmus bei L - Zellen beträgt etwa 36 Stunden -, bevorzugt vom menschlichen Serum in ihrer zellelektrophoretischen Beweglichkeit verändert werden. Diese Annahme wird gestützt durch den Befund, daß sich die Meßwerte der elektrophoretischen Beweglichkeit nach Inkubation von L - Zellen mit frischem menschlichem Serum in Form einer symmetrischen Gaußkurve verteilen.

Die in Gewebekultur wachsenden L-, Hela- und KB - Zellen, die in Ascitesform wachsenden Zajdela-Hepatom- und Yoshida-Tumor-Zellen, sowie autologe und heterologe Knochenmark- und Milzzellen erfahren nach Inkubation mit Humanserum eine Verringerung ihres Membranpotentials. Erythrocyten, periphere Leukozyten und Leukämiezellen werden von Humanserum in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit nicht beeinflußt und sind nicht in der Lage, die Serumeigenschaft zu erschöpfen. Das kann darauf beruhen, daß den peripheren Blutzellen die Receptoren für diese Serumfaktoren fehlen.

Zellelektrophoretische Untersuchungen an Knochenmarkszellen und Tumorzellen zeigten, daß diese Zellen ein jeweils höheres

negatives Membranpotential als die entsprechenden peripheren Blutzellen und Tumormutterzellen besitzen (61, 26, 27). Es wäre möglich, daß in diesen Beispielen beim Zellreifungsvorgang, der mit einer Abnahme der elektrophoretischen Beweglichkeit verbunden ist, diese Rezeptoren verschwinden, während bei einer intensiven Gewebsproliferation neue Rezeptoren an den Zellen auftreten könnten, die fähig sind, bestimmte Serumstoffe zu binden.

Ein Teil der geschilderten Ergebnisse erinnert an die Beobachtungen, die Fedoroff, Ginsburg, Goldberg und Hotham-Iglewski bei der Untersuchung der cytotoxischen Wirkung von Humanserum auf verschiedene Zellarten machten, wobei alle genannten Autoren den cytotoxischen Einfluß des Serums mit einem Antikörper-Komplement-System in Verbindung brachten: Die Wirkung des Serums auf die Membranladung geht bei Erhitzen auf 56° verloren und läßt sich durch Inkubieren mit einem Überschuß an Zellen erschöpfen; sie benötigt zwei verschiedene Faktoren, von denen der eine, ein γ G-Globulin, bei 0° an die Zellen gebunden wird. Auch die Art des Zusammenwirkens der beiden Faktoren erinnert an eine Komplementreaktion, wie sie z.B. im hämolytischen System vorliegt, wo sensibilisierte Erythrocyten, die mit einem spezifisch gegen sie gerichteten Antikörper beladen sind, durch das Hinzutreten von Komplement bei 37° hämolysiert werden. Die Beteiligung des gesamten Komplementsystems scheint jedoch bei unseren Versuchen ausgeschlossen, da eine Abhängigkeit von dem Vorhandensein von Mg^{++} und Ca^{++} -Ionen nicht nachweisbar war und da bei der membranaktiven Kombination von A_1F_1 und A_2F_1 keine Komplementaktivität im Komplementfixationstest nach Aster (55) gefunden wurde. Das aber bedeutet, daß das untersuchte membranaktive System in keinem direkten Zusammenhang mit dem cytotoxischen Antikörper-Komplement-System der oben erwähnten Autoren steht.

Die Tatsache, daß sich die membranaktiven Faktoren durch mehrmaliges Inkubieren mit Zellen, die durch Humanserum in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit verändert werden, erschöpfen lassen, macht eine direkte enzymatische Einwirkung dieser Faktoren auf die Zellmembran unwahrscheinlich. Ein erschöpftes Serum wirkt auf keine der Zelltypen, die ihre Membranladung nach der Inkubation verändern. Das deutet darauf hin, daß die gleichen Faktoren aus dem Humanserum für die Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit verschiedener Säugetierzellen verantwortlich sind.

Einige Ergebnisse lassen vermuten, daß es sich bei dem Faktor, der in A_1F_1 enthalten ist, um einen natürlichen Antikörper handelt: γG - Globuline machen etwa 72 % der Immunglobuline aus, die sich im einzelnen noch aus den Untergruppen γA , γM und γD zusammensetzen und deren biologische Bedeutung durch den hohen Gehalt an Antikörpern bestimmt wird (60). Auch lassen sich viele natürliche Antikörper bei 0° an Zellen adsorbieren. Schließlich ist bekannt, daß Antikörper die elektrophoretische Beweglichkeit von Zellen beeinflussen können. Dies wurde 1921 am Beispiel von Erythrocyten gezeigt (63): Sachtleben und Ruhenstroth-Bauer fanden, daß Blutgruppenantikörper für diese Wirkung verantwortlich sind (64, 35). Bei der verlangsamenden Wirkung des Humanserums auf bestimmte Säugetierzellen läßt sich jedoch keine Abhängigkeit der Serum-eigenschaft von der Art der Blutgruppen A B O oder des Rhesusfaktors zeigen.

Der Faktor in A_1F_1 wird erst nach der Geburt gebildet, während die Komponente in A_2F_1 schon im Nabelschnurserum enthalten ist. Beide Faktoren werden durch Erhitzen auf 56° zerstört.

Die elektrophoretische Beweglichkeit verschiedener Säugetierzellen wird erst dann verändert, wenn die mit dem Faktor aus

A_1F_1 besetzten Zellen mit A_2F_1 bei 37° inkubiert werden. Diese Wirkung ist reversibel, da sie sich durch mehrmaliges Waschen mit physiologischer Kochsalzlösung beseitigen läßt.

Die Befunde machen es wahrscheinlich, daß auch der für die zellelektrophoretisch erfaßbare Membranveränderung erforderliche 2. Faktor (A_2F_1) ein γ G-Globulin ist. Bei mehreren immunoelektrophoretischen Untersuchungen von A_2F_1 war zwar eine angedeutete Bande im β -Bereich zu sehen; diese Bande trat jedoch nicht bei allen untersuchten Auftrennungen auf, wie mit A_1F_1 volle Aktivität zeigten. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, daß ein Lipoproteid in Verbindung mit A_1F_1 für die Wirkung auf das Membranpotential der Zellen verantwortlich ist.

Hinsichtlich der biologischen Bedeutung, die diese membranaktiven Faktoren haben könnten, ergeben sich aus den bisherigen Untersuchungen keine eindeutigen Hinweise. Beide Komponenten verhindern in 1 %iger Lösung im Nährmedium zwar das Anheften einer bestimmten Anzahl von L - Zellen an die Glaswand der Kulturflaschen. Diese Wirkung üben aber auch andere Eiweißfraktionen des Serums aus, die auf das Oberflächenpotential von teilungsaktiven Zellen keinen Einfluß haben. Da es sich jedoch bei A_1F_1 mit großer und A_2F_1 mit einiger Wahrscheinlichkeit um ein γ G - Globulin handelt, könnte dieses membranaktive System mit dem Abwehrmechanismus des Serums in Zusammenhang stehen.

Zusammenfassung

- 1.) Humanserum vermindert das negative Oberflächenpotential einer Reihe von Säugetierzellen, wie Tumorzellen, Knochenmarkzellen und Zellen, die in der Gewebekultur wachsen wie L - Zellen. Periphere Blutzellen, werden durch Humanserum in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit nicht beeinflußt.
- 2.) 95 % der bisher untersuchten Humanseren sind membranaktiv, 3 von 6 der ausgetesteten Kaninchenseren besaßen die gleiche Wirkung. Seren von Neugeborenen, Kalb, Meer-schweinchen, Ratte und Maus zeigen keine Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit bei teilungsaktiven Zellen. Nicht aktive Humanseren zeigten keine Abhängigkeit von der Blutgruppenzugehörigkeit (A B O), vom Rhesusfaktor oder vom Gesundheitszustand des Spenders.
- 3.) Die Wirkung von aktivem Serum auf teilungsaktive Säugetierzellen zeigt nach den bisherigen Ergebnissen keine Abhängigkeit vom Stadium des Teilungsrhythmus', in welchem sich die Zellen befinden.
- 4.) Die elektrophoretische Beweglichkeit von L - Zellen wird durch 2 Faktoren aus dem Humanserum verlangsamt, von denen einer (A_1F_1) immunelektrophoretisch einem γ G-Globulin entspricht. Der 2. Faktor (A_2F_1) liegt immunelektrophoretisch weitgehend gereinigt vor und bildet ebenfalls eine γ G - Bande. Der erste Faktor ist bei 0° und 37° an Zellen adsorbierbar und führt allein zu keiner Veränderung des Membranpotentials. Er ist im Nabelschnurserum nicht enthalten. Der 2. Faktor führt nur in Verbindung mit dem ersten zur Membranwirkung bei 37° . Er ist im Nabelschnurserum enthalten und wird bei 0° nicht an Zellen adsorbiert. Beide Faktoren lassen sich durch Erhitzen

während 10 Minuten bei 56° inaktivieren und sind nicht dialysabel.

- 5.) Die Wirkung der Faktoren auf die Zellmembran ist nicht vom Vorhandensein eines vollständigen Komplementsystems abhängig.
- 6.) Zwischen den von Fedoroff, Ginsburg und Goldberg beschriebenen cytotoxischen Systemen, die auf Gewebekulturen und Proliferation von Tumorzellen wirken, und dem membranwirksamen System des Humanserums besteht kein Zusammenhang.

Literaturverzeichnis

- 1.) Earle, W.R.: J. Nat. Cancer Inst.: 4, 165 (1943)
- 2.) Sanford, K.K., Hobb, G.L. and Earle, W.R.: Cancer Res. 16, 162 (1956)
- 3.) Fedoroff, S.: Anat. rec.: 121, 394 (1955)
- 4.) Fedoroff, S. and Doerr, J.: J. Nat. Cancer Inst.: 29, 33 (1962)
- 5.) Fedoroff, S.: Texas Rep. Biol. and Med.: 16, 32 (1962)
- 6.) Fedoroff, S. and Doerr, J.: Anat. rec. 139, 301 (1961)
- 7.) Landy, M. and Shear, M.J.: J. Exp. Med.: 106, 77 (1957)
- 8.) Fedoroff, S. and Webb, S.J.: Nature (London), 193, 80 (1962)
- 9.) Fedoroff, S. and Cook, B.: J. exp. Med. 109, 615 (1959)
- 10.) Ginsburg, J., T. Dishon, M. Bloch and J. Cross: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.): 107, 235 (1961)
- 11.) Goldberg, B. and J. Green: J. exp. Med.: 109, 505 (1959)
- 12.) Landy, M., J.G. Michael, R.J. Trapani, B. Achinstein, M.M. Woods, M.J. Shear: Cancer Res.: 20, 1279 (1960)
- 13.) Hotham-Iglewski, B. and E.H. Ludwig: Cancer Res. 27, 181 (1967)
- 14.) Nordling, S., K. Penttinen and E. Saxén: Exp. Cell Res.: 31, 586 (1963)
- 15.) Saxén, E. and Penttinen, K.: J. Nat. Cancer Inst.: 27, 1367 (1961)
- 16.) Penttinen, K., and Saxén, E.: Ann. Med. exp. Fenn.: 34, 22 (1956)
- 17.) Saxén, E. and Penttinen, K.: J. Nat. Cancer Inst.: 35, 67 (1965)

- 18.) Penttinen, K. and E. Saxén: Ann. Med. exp. Fenn.: 35, 335 (1957)
- 19.) Häyry, P.: Ann. Med. exp. Biol. Fenn.: 8, 44 (1966)
- 20.) Nordling, S., A. Vaheri, E. Saxén and K. Penttinen: Exp. Cell. Res. 37, 406 (1965)
- 21.) Häyry, P.: Dissertation, Univ. Helsinki (1966)
- 22.) Ruhenstroth-Bauer, G., G.F. Fuhrmann, G. Granzer, W. Kübler und F. Rueff: Naturwissenschaften: 49, 363 (1962)
- 23.) Hear, D.H., G.V. Seaman and Simon-Reuss, J.: Nature (London) 190, 1109 (1961)
- 24.) Ruhenstroth-Bauer, G., E. Straub, P. Sachtleben und G.G. Fuhrmann: München. med. Wschr.: 103, 794 (1961)
- 25.) Ruhenstroth-Bauer, G. und Fuhrmann, G.F.: Zeitschrift für Naturforschung: 16, 252 (1961)
- 26.) Ambrose, E.J., A.M. James and J.H. Lowick: Nature: 177, 576 (1956)
- 27.) Fuhrmann, G.F., G. Granzer, E. Bey und G. Ruhenstroth-Bauer: Zeitschr. f. Naturforschung, 19 b, 613 (1964)
- 28.) Fuhrmann, G.F., Inaug. Dissertation, Universität München
- 29.) Fuhrmann, G.F. and G. Ruhenstroth-Bauer in: Cellelektrophoresis 22, J.A. Churchill Ltd., London
- 30.) Bey, E.: Inaug. Dissertation, Universität München (1964)
- 31.) Arnold, R.: Inaug. Dissertation, Universität München (1964)
- 32.) Biochem. J.: 234, 139 (1931)
- 33.) Documenta Geigy, Wissenschaftl. Tab. pp. 277
- 34.) Ruhenstroth-Bauer, G., J.G. Gostomzyk und R. Arnold: Strahlentherapie 122, 56 (1963)
- 35.) Sachtleben, P., G. Ruhenstroth-Bauer: Med. Exp. 6, 183 (1962)

- 36.) Gey, G.O., W.D. Coffmann and M.T. Kubicek: Proc. Am. Assoc. Cancer Res.: 12, 264 (1952)
- 37.) Eagle, H.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.: 89, 362 (1955)
- 38.) Monier, R., P. Zajdela, P. Chaix and J.F. Petit: Cancer Res. 19, 927 (1959)
- 39.) Yoshida, T.: Gann 40, 1 (1949)
- 40.) Rueff, F., G.F. Fuhrmann, G. Ruhenstroth-Bauer: Münchener Med. Wochenschrift 105, 1242 (1963)
- 41.) Dücke, C.: Inaug. Dissertation, Universität München (1967)
- 42.) Burkhardt, R.: Blut 13, 337 (1966)
- 43.) Boyer, A.: Nature 204, 793 (1964)
- 44.) Gutmann, J.: Dissertation, Techn. Hochschule München (1965)
- 45.) Schiebel, W., G. Nass, M. Eulitz und G. Ruhenstroth-Bauer: Hoppe Seyler's Zeitschr. für physiologische Chemie 338, 198 (1964)
- 46.) Sober, H.A. and E.A. Peterson: Fed. Proc.: 17, 1116 (1958)
- 47.) Stanworth, D.R.: Nature: 188, 156 (1960)
- 48.) Peterson, E.A., M.M. Wyckhoff and H.A. Sober: Arch. Biochem. Biophys.: 93, 428 (1961)
- 49.) Adlkofer, F.: Inaug. Dissertation, Universität München (1966)
- 50.) Bailey, J.L.: Techn. in Prot. Chemistry (1962)
- 51.) Lowry: J B C 193, 265 (1951)
- 52.) Eggstein, M.: Klin. Wochenschrift 33, 879 (1955)
- 53.) Grabar, P., G.A. Williams: Bioch. biophys. Acta 10, 193 (1953)

- 54.) Benoitdegger, J.L.: Int. Arch. Allergy appl. Immunol: 7, 103 (1955)
- 55.) Aster, R., H.E. Cooper, D.L. Singer: J. clin. Path. 63, 161 (1964)
- 56.) Mayer, M.M., C.C. Croft and M.M. Grey: J. exp. Med.: 88, 427 (1948)
- 57.) Kabat, E.A. and M.M. Mayer in: Exptl. Immunochemistry, Ed. 2, Charles C. Thomas (Springfield, Ill.) pp 149
- 58.) Hirschfeld, J.: Science Tools: Vol. 7, Nr. 2, 18 (1960)
- 59.) Kabat, E.A., M.M. Mayer in: Exptl. Immunochemistry, Ed. 2 Charles C. Thomas (Springfield, Ill.) p 148 (1961)
- 60.) Sinclair, Bishop: Nature: 205, 1272 (1965)
- 61.) Arnold, R.: in Cellelectrophoresis, p. 192 ed. by E.J. Ambrose, J.A. Churchill Ltd. London, publ. 1965
- 62.) Hein, H.: Fortschritte der Medizin, 5, 194 (1967)
- 63.) Coulter, C.: J. gen. Physiol. 3, 309 (1921)
- 64.) Gacktleben, P. and G. Ruhenstroth-Bauer: Nature 192, 982 (1961)

Lebenslauf

Am 30.11.1942 wurde ich in Guben als Sohn des Oberstleutnant i.G. Hasso v. Boehmer und seiner Frau Käthe, geb. Torhorst, geboren. Mein Vater gehörte zum Kreis der Widerstandskämpfer des 20. Juli 1944 und wurde am 5.3.1945 in Berlin-Plötzensee hingerichtet.

Ich besuchte die Volksschule in Wuppertal, das humanistische Gymnasium in Wuppertal und in Freiburg i.Br., wo ich am 17.3.1962 das Abitur ablegte.

Ich begann in Göttingen im Sommersemester 1962 mit dem Medizinstudium. Nach dem Vorphysikum studierte ich an der Freiburger Universität, wo ich im Oktober 1964 das Physikum bestand. Ich setzte das klinische Studium an der Universität München fort. Zur Zeit stehe ich im medizinischen Staatsexamen.

Im Max-Planck-Institut für Biochemie in München arbeitete ich von März 1965 bis März 1967.

